



TITLE:

Protein structure determination using magnetically oriented microcrystals(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tsukui, Shu

CITATION:

Tsukui, Shu. Protein structure determination using magnetically oriented microcrystals.
京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19901>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-05-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	津久井秀
論文題目	Protein structure determination using magnetically oriented microcrystals (磁場配向微結晶を用いたタンパク質の結晶構造解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>タンパク質、多糖、核酸等の生体高分子の高次構造はその機能と密接に結びついているので、これらの物質を医薬、食品、材料分野で利用していく上で高次構造の解明は大変重要である。高次構造解析には単結晶構造解析法が利用されるが、そのためには所定の大きさの単結晶が必要とされる。しかしながら、多くの場合、結晶は微結晶粉末の形で得られるため、単結晶法の活用には限界がある。放射光利用技術の進歩により測定可能な単結晶のサイズは年々小さくなっているとはいえ、結晶サイズの制限は、単結晶構造解析を行う上で依然ボトルネックとなっている。特に中性子線回折測定にはミリメートルサイズの結晶が必要とされるが、生体高分子からこのようなサイズの単結晶を得るのは困難な場合が多い。また、粉末試料からの回折にもとづいて構造解析を行う粉末構造解析法も広く利用されているが、単結晶法に比べ信頼性が十分高いとはいえず、特にタンパク質の構造解析では報告例は少ない。</p> <p>他方、磁場を用いて結晶方位を制御する方法が知られている。微結晶集合体に時間的に変調された磁場を印加することにより、すべての微結晶の結晶軸を3次元的に配向させる技術が存在する。しかしながら、これまでにこの配向技術を生体高分子の結晶構造解析に応用した例は一例あるのみである。</p> <p>本論文では、モデルタンパク質としてリゾチーム微結晶を選び、その3次元配向を固定化して得られる試料 (Magnetically Oriented Microcrystal Array: MOMA) から、X線単結晶構造解析に成功している。更に、50 μm サイズの微結晶粉末から MOMA を作製し、初めて中性子線単結晶回折像を得ている。本論文の内容は以下のとおりである。</p> <p>第一章は序論で、本研究のタンパク質構造解析分野での位置づけと、磁場配向に関する現状について述べられている。</p> <p>第二章では、従来法より簡便な3次元磁場配向法を探索するため、磁場配向の動力学について検討がなされた。高速磁場回転下での3次元配向に関しては、詳しい研究がなされていたが、低速磁場回転下での配向挙動に関しては十分解析がなされていなかった。低速回転下で3次元配向が可能ならば、MOMA の作製法が簡便化されるため、本章ではその可能性が調査された。その結果、微結晶の形状が球形ならば低速回転下で3次元配向が可能であることが示唆されたが、形状が棒状の場合には、形状軸と磁化軸との相対関係に依存して、3次元配向しない場合があることが実験、及びシミュレーションで明らかにされた。多くの場合、測定しようとする微結晶の形状は均一ではない。従って、3次元配向試料の作製には低速回転磁場は利用できず、専ら高速磁場回転を用いる必要があることが明らかになった。</p> <p>第三章では、リゾチーム微結晶を紫外線硬化樹脂で配向固定した MOMA を作製し、放射光 (SPring-8) にて 1.8 Å の分解能で結晶構造を決定した。先行研究においてインハウスの回折装置を用いた同様の解析が行われていたが、得られた分解能は 3 Å であった。この分解能では側鎖の構造解析には不十分なため、より高解像度が求められていた。放射光の利用、及び試料作製技術の向上により高解像度が得られるに至った。また本章ではモザイシティ (mosaicity) の原因を微結晶固有の寄与、光学系の不均一性による寄与、</p>			

配向固定時の配向乱れによる寄与に分離して評価がなされた。放射光を利用した場合には、配向固定時の配向乱れによる寄与が相対的に大きいことが示された。**MOMA** 法の有利な点として、散乱体積中の微結晶の総量が多いために回折強度が強いこと、及びX線損傷が小さいことが挙げられている。実際、通常はX線損傷を抑えるために試料を冷却しながら回折測定を行うが、本方法では、常温で測定が行われた。

第四章では、配向固定に親水性ゲルを用いた方法が報告されている。紫外線硬化樹脂を用いる場合の問題点として、試料の回収が不可能、及び紫外線硬化用モノマーとタンパク質微結晶の親和性が低いという点が挙げられる。そのため、本章ではゼラチンゲルを固定化剤とした研究が報告されている。リゾチーム微結晶をゼラチンゲルで配向固定したゲル **MOMA** を用いてX線単結晶構造解析を行った。その結果、放射光、及びインハウス測定において、各々1.8 Å、2.4 Åの分解能で構造が決まり、ゲルを用いても高分解能が得られることが証明された。更に、親水性ゲルの利用は、中性子線回折測定に大きなメリットがあることが示された。中性子線回折では、軽水素による非干渉性散乱が大きなノイズとなり、分解能を低下させる。親水性ゲルを用いた場合には、軽水でなく重水を用いることができるので、非干渉性散乱を大幅に減少させることが可能である。実際、リゾチーム微結晶を重水で調製したゼラチンゲルで配向固定したゲル **MOMA** を中性子線回折に供したところ、最高 3.4 Åの回折点を観測することに成功している。本測定で用いた微結晶のサイズは 50 μm 程度であり、通常ミリメートルサイズの結晶が必要とされる中性子線回折においては、大きなメリットとなる。

第五章は総括であり、本研究で得られた主要な成果を要約している。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質、多糖、核酸等の生体高分子の高次構造解析にはX線、中性子線による回折法が用いられる。これらの手法においては、所定の大きさの単結晶が必要とされるが、多くの場合、試料は微結晶粉末で得られるため、それが回折法のボトルネックとなっている。本論文は、微結晶粉末を磁場により配向させた試料(MOMA)を用いることにより、この困難を克服しようとするものである。本論文では、タンパク質微結晶粉末から、X線、中性子線単結晶回折像を得ることが可能であることが示されている。X線回折法では、 1.8\AA の分解能での構造解析に成功している。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 従来法より簡便な3次元磁場配向法を探索するため、磁場配向の動力学について検討がなされた。低速回転磁場では、微結晶の形状軸と磁化軸との相対関係に依存して3次元配向しない場合があることを実験、及びシミュレーションで示し、3次元配向のためには高速磁場回転が必須であることを明らかにした。
2. リゾチーム微結晶を紫外線硬化樹脂で配向固定した試料を作製し、 1.8\AA の分解能で結晶構造を決定した。モザイシティ(mosaicity)には配向固定時の配向乱れの寄与が大きいことが示された。
3. リゾチーム微結晶をゼラチンゲルで配向固定した試料を作製し、 1.8\AA の分解能で結晶構造を決定した。重水で調製したゼラチンゲルを配向固定剤とした試料を用いることにより、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 程度の微結晶粉末から、中性子線回折像を得ることに成功した。

以上のように、本論文はタンパク質微結晶粉末試料を磁場配向させ、その状態を固定した試料から、単結晶と同等のX線、中性子線回折像が得られることを示したものであり、X線・中性子線構造学、タンパク質構造学、材料科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年3月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)